

PASANTIA NACIONAL EN DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIONES
BACTERIANAS COMO HERRAMIENTA ESTRATÉGICA PARA LA
CERTIFICACIÓN SANITARIA DE CENTROS DE PRODUCCIÓN DE TRUCHA
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y TILAPIA (*Oreochromis spp*) EN EL
DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA.

ELKIN DARIO CIFUENTES NIÑO

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
TUNJA
2017

PASANTIA NACIONAL EN DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIONES
BACTERIANAS COMO HERRAMIENTA ESTRATÉGICA PARA LA
CERTIFICACIÓN SANITARIA DE CENTROS DE PRODUCCIÓN DE TRUCHA
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y TILAPIA (*Oreochromis spp*) EN EL
DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA.

ELKIN DARIO CIFUENTES NIÑO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el Título de Médico Veterinario
Zootecnista.

TUTOR INTERNO: Giovanni Torres Vidales. Médico Veterinario Zootecnista.

TUTOR EXTERNO: Cristian Leandro Cantor Hernández. Médico Veterinario Zootecnista

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUNJA

2017

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| OBJETIVOS | 7 |
| 1. OBJETIVO GENERAL: | 7 |
| 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 7 |
| JUSTIFICACIÓN | 8 |
| 1. ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA | 10 |
| 1.1 INFORMACION GENERAL..... | 10 |
| 1.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA..... | 11 |
| 1.3 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PROPUESTAS A REALIZAR | 11 |
| 2. DESARROLLO Y DESCRIPCION DEL PROYECTO..... | 12 |
| 2.1 ESTADO DEL ARTE | 12 |
| 2.1.1 Infecciones y enfermedades bacterianas en Truchas. | 12 |
| 2.1.1.1 Signos clínicos de la Columnarosis (<i>F. columnae</i>)..... | 13 |
| 2.1.1.2 Signos clínicos de la enfermedad de las aguas frías (<i>F. psychrophilum</i>) . | 14 |
| 2.1.1.3 Diagnóstico de enfermedades bacterianas en truchas | 15 |
| 2.1.1.3.1 Diagnóstico por cultivo para <i>flavobacterias</i> | 15 |
| 2.1.1.3.2 Diagnóstico molecular y serológico para infecciones bacterianas en truchas | 16 |
| 2.1.1.4 Prevención, control y tratamiento de la infección por <i>Flavobacterium spp.</i> | 17 |
| 2.1.2 Infecciones y Enfermedades Bacterianas en Tilapia | 18 |
| 2.1.2.1 Signos clínicos de la enfermedad causada por <i>Streptococcus spp</i> en peces. | 18 |
| 2.1.2.2 Signos clínicos y hallazgos histopatológicos de la enfermedad causada por <i>Streptococcus</i> en peces. | 19 |
| 2.1.2.3 Diagnóstico de streptococcosis. | 20 |
| 2.1.2.4 Prevención y Terapia | 21 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN..... | 22 |
| Área de estudio | 22 |
| 3.2 PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS | 25 |
| 3.2.1 Salidas de campo y manejo de muestras. | 26 |
| 3.2.2 Registro de parámetros morfológicos. (Imagen 2)..... | 27 |
| 3.2.3 Registro de variables ambientales (Imagen 3) | 28 |
| 3.2.4 Registro físico-químico del agua | 28 |
| 3.2.5 Examen histopatología para truchas y tilapias. | 29 |
| 3.2.6 Examen Bacteriológico de tejidos para <i>Streptococcus sp.</i> | 32 |
| 3.2.7 Examen Bacteriológico de tejidos para <i>Flavobacterias sp</i> | 33 |
| 3.2.8 Extracción de DNA, a partir de tejidos y lesiones..... | 33 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.8.1 | Protocolo de extracción de DNA en tejido para detección de bacterias manualmente. | 37 |
| 3.2.9 | <i>Diagnóstico molecular por PCR en tiempo real y convencional para infecciones bacterianas en tilapia</i> | 41 |
| 3.2.10 | <i>Diagnóstico molecular por PCR en tiempo real y convencional para infecciones bacterianas en trucha.</i> | 41 |
| 3.2.11.1 | Análisis molecular (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | 42 |
| 4 | BIBLIOGRAFÍA | 46 |

ILUSTRACIONES

| | | |
|-----------------|--|----|
| Ilustración 1. | Laboratorio móvil para salidas de campo. | 27 |
| Ilustración 2. | Registros Morfometricos. | 27 |
| Ilustración 3. | Estaciones meteorológicas WS - 1516 – IT..... | 28 |
| Ilustración 4. | Multiparametro Modelo YS1556..... | 29 |
| Ilustración 5. | Necropsia para retirar órganos de interés. | 29 |
| Ilustración 6. | Procesador de tejidos de la U. Antioquia. | 30 |
| Ilustración 7. | Tejido incluido en parafina | 30 |
| Ilustración 9. | Toma aséptica de muestras para cultivo. | 33 |
| Ilustración 10. | Laboratorio de biología molecular de la U. CES..... | 34 |
| Ilustración 11. | Mezcla de la muestra con Vortex. | 35 |
| Ilustración 12. | Adición de buffers de lisis. | 35 |
| Ilustración 13. | Columna de union (QLAamp DNA mini Kit, Qiagen) | 36 |
| Ilustración 14. | Medición de purea de ADN..... | 37 |
| Ilustración 15. | Programación del equipo Real-Time PCR systems 7300 Applied Biosystem. | 42 |
| Ilustración 16. | Interpretación de resultados por PCR en tiempo real. | 43 |

TABLAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 1. | Cronograma de Actividades Realizadas. | 11 |
| Tabla 2. | Ubicación de los sistemas de Producción. | 23 |
| Tabla 3. | Protocolo de Toma de Muestras. | 25 |
| Tabla 4. | Resultado Histopatológico de <i>Flavobacterium</i> positivo a PCR. | 31 |
| Tabla 5. | Preparación de Buffer enzimático. | 38 |
| Tabla 6. | Preparación de Buffer Enzimático..... | 40 |

MAPAS

| | |
|--|----|
| Mapa 1. ASOACUICOLA, Carrera 66- 48 c 13, Medellín, Antioquia. | 11 |
| Mapa 2. Ubicación centros de producción de tilapia y trucha en el Departamento de Antioquia. | 24 |
| Mapa 3. Frecuencia de detección de agentes bacterianos mediante PCR en Tiempo Real en centros de cultivos de trucha arcoíris en diferentes subregiones del Departamento de Antioquia. | 45 |

INTRODUCCION

Durante los últimos 27 años en Colombia se ha tenido un promedio anual de crecimiento en la producción acuícola del 13%, destacándose especialmente el campo de la mediana y pequeña acuicultura, la cual ha venido reemplazando a la producción pesquera nacional de extracción o captura, posicionando al país en el sexto lugar en orden de importancia de la acuicultura en América Latina (Merino, et al)

Aun con estas cifras de crecimiento en la producción acuícola en el país, no existen políticas gubernamentales que apoyen efectivamente esta actividad, presentándose producciones desordenadas, desorientadas, sin planificación y con repercusiones negativas en el medio ambiente (Parrado, Y. 2012)

En Colombia las principales especies cultivadas son: tilapia 8,5%, cachama 19,25%, y trucha 5.04%, convirtiéndose en las producciones con mayor movimiento económico dentro de la acuicultura en el país y generando gran cantidad de empleos. Por esta misma razón se hace necesario el desarrollo de investigaciones y nuevas políticas que fortalezcan este tipo de producciones para convertir a Colombia en una nación referente y competente en la acuicultura de la región. (Sotorrío y Martín. 2010)

La Medicina Veterinaria y Zootecnia, cumple uno de los papeles más importantes en el campo de la acuicultura, ya que a través de profesionales formados en estas áreas se pretende dar solución a problemáticas en sanidad, nutrición, salud pública, mercadeo y el desarrollo integral de la producción como tal, haciendo necesario que dentro de la formación del profesional, pueda éste realizar prácticas o pasantías que fortalezcan sus conocimientos y creen experiencia para desempeñarse con bases sólidas en su futuro laboral.

Como profesional en formación me vínculo con La Asociación Colombiana de Acuicultores (ASOACUICOLA), con sede principal en la ciudad de Medellín, para desarrollar mi pasantía, esta es una entidad comprometida con el desarrollo de investigaciones a favor de la acuicultura. Cuenta con personal profesional calificado en las áreas de la Biología y Veterinaria y Zootecnia quienes desarrollan proyectos de investigación como estrategias para

beneficiar y mejoran la producción acuícola del país. Dentro de los principales proyectos que viene realizando esta asociación se encuentra un Programa de monitoreo sanitario – ambiental y diagnóstico molecular de infecciones bacterianas como herramienta estratégica para la certificación sanitaria de centros de producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis spp*) en el departamento de Antioquia”. Programa en el cual fui incluido con el fin de desarrollar actividades complementarias al proyecto.

OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Conocer los diferentes procesos diagnósticos y posibles soluciones a factores patológicos que se presentan en los individuos a evaluar

2. Objetivos específicos:

- Conocer el diagnóstico molecular por PCR convencional y PCR en tiempo real de diferentes patógenos bacterianos extraídos de muestras de tejidos de trucha arcoíris.
- Aprender del manejo sanitario integral para centros de producción de trucha, enfocado a la certificación sanitario – ambiental de procesos y productos
- Adquirir conocimientos y experiencia con el fin de dar aportes en pro del avance en el sector acuícola del departamento de Boyacá.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios sectoriales y análisis prospectivos realizados para el sector acuícola nacional, han permitido identificar diferentes problemáticas que limitan el crecimiento de esta actividad, y que a su vez aumenta el tamaño de las brechas, de tipo tecnológico existentes, con los países referentes para esta actividad y afecta las exportaciones o ingreso del producto nacional a nuevos mercados. Específicamente, para el sector de la trucha se identifican problemáticas en los diferentes eslabones y segmentos de la cadena de producción, entre ellos: Proveedores de insumos: materias primas y calidad de los piensos, falta de semilla (ovas - alevinos) y dependencia de importaciones. Productores de alevinos- carne: Mejoramiento genético, problemas sanitarios, Comercializadores:

La globalización y la expansión de los mercados, al igual que consolidación de diferentes tratados comerciales, hace necesario que las diferentes regiones productivas agropecuarias del país, enfrenten grandes retos para superar limitaciones de tipo no arancelario. El aspecto sanitario, se convierte en una de las principales limitaciones para acceder a los mercados internacionales. Existen falencias y limitaciones, en cuanto a la capacidad instalada (laboratorios) y desarrollo de técnicas de altos estándares, lo que hace referencia a alta sensibilidad y especificidad de las pruebas.

A nivel nacional es limitada la cantidad de laboratorios de técnicas moleculares y muchos de estos, son empleados específicamente para fines de investigación, sin integrarlos directamente a procesos productivos de las cadenas agropecuarias a nivel nacional. La industria agropecuaria y en particular el sector acuícola, hacia el cual este proyecto tiene un enfoque particular, presenta limitaciones en el nivel de certificación, tanto de los centros de producción, como los procesos y los productos. El Sub-sector de la trucha arcoíris, ha visto como los niveles de exportaciones han disminuido en esta última década, precedida de unos niveles en aumento para la década de los 90s, las barreras de tipo no arancelarias, especialmente la restricción de tipo sanitario se ha convertido en una de las principales limitaciones para que la trucha nacional, no haya podido ingresar a nuevos mercados y dinamizar la comercialización de este producto. La Agenda Prospectiva de Investigación y

Desarrollo Tecnológico para la Cadena de la Trucha en Antioquia, identifica en su análisis sectorial y después de realizar un Benchmarking de desempeño con los países referentes, que el desarrollo de tecnologías diagnósticas y el control sanitario, son unas de las principales demandas de tipo tecnológico que presenta la cadena productiva de la trucha arcoíris, y se convierte en un factor que limita la competitividad.

1. ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

1.1 INFORMACION GENERAL

- **RAZON SOCIAL:** Asociación Colombiana de Acuicultores
- **SIGLAS:** Asoacuicola
- **MATRICULA MERCANTIL:** 274028- 21
- **DIRECCIÓN ACTUAL:** Carrera 66 48 c 13, Medellín, Antioquia
- **TELEFONO:** 3104240752
- **FORMA JURIDICA:** ORGANIZACION DE ECONOMIA SOLIDARIA
- **CAMARA DE REGISTRO ACTUAL:** C.C. MEDELLIN
- **ACTIVIDAD CIU:** A0322 - ACUICULTURA DE AGUA DULCE
- **OBJETIVO SOCIAL:** Es una ENTIDAD SIN ANIMO DE LUCRO registrada en la cámara de comercio de MEDELLIN PARA ANTIOQUIA, con número de matrícula 0000274028.
- **OBJETIVO:** giro, rubro principal Acuicultura de agua dulce.

1.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA

Mapa 1. ASOACUICOLA, Carrera 66- 48 c 13, Medellín, Antioquia.



Fuente: www.google.com.co/maps/place/

1.3 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PROPUESTAS A REALIZAR

Tabla 1. Cronograma de Actividades Realizadas.

| ACTIVIDAD | Tiempo en Meses | | | | | |
|--|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 1er Mes | 2do Mes | 3er Mes | 4to Mes | 5to Mes | 6to Mes |
| Capacitación y reconocimiento de las instalaciones | | | | | | |
| Reconocimiento del proyecto macro | | | | | | |
| Capacitación en la toma de muestras | | | | | | |
| Colaboración en la redacción y ejecución de nuevos trabajos de investigación | | | | | | |
| Toma de muestras en campo para biología molecular, microbiología e histopatología. | | | | | | |
| Procesamiento de muestras para biología molecular | | | | | | |
| Procesamiento de muestras para histopatología | | | | | | |
| Descripción histopatológica de las muestras procesadas | | | | | | |

| | | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|--|
| Creación de informes de resultados de histopatología | | | | | | |
| Creación de análisis estadísticos y discusión de los resultados obtenidos | | | | | | |
| Colaboración en la creación de un atlas de ictiopatología. | | | | | | |
| Colaboración en el desarrollo de otros trabajos investigativos | | | | | | |
| Redacción del informe final | | | | | | |
| Presentación del informe final | | | | | | |

Fuente: Autor

2. DESARROLLO Y DESCRIPCION DEL PROYECTO

2.1 ESTADO DEL ARTE

2.1.1 Infecciones y enfermedades bacterianas en Truchas.

Las patologías de origen bacteriano representan un riesgo importante en el desarrollo de la acuicultura continental (Padrós y Furones 2002). Las bacterias Gram negativas son las principales causantes de enfermedades en los salmónidos; siendo el grupo de las flavobacterias responsables de cuadros patológicos habituales que afectan la piel, aletas y branquias y son conocidas como la “enfermedad bacteriana de la branquia” o “enfermedad de la columnaris”; pero en algunos casos como las infecciones por *F. psychrophilum* (Bernardet et al. 1996) pueden llegar a producir además serios procesos septicémicos (Padrós y Furones, 2002).

F. psychrophilum es un bacilo Gram negativo que origina diversas patologías en peces salmónidos, desde necrosis ulcerativa de la piel hasta una infección sistémica (Holt et al. 1993). Esta patología ha recibido diferentes denominaciones: “enfermedad del pedúnculo”, “enfermedad del agua fría” (CWD) (Borg, 1960), “enfermedad bacteriana del agua fría” (BCWD) (Holt et al. 1993) y el “síndrome del alevín de la trucha” (RTFS) (Rangdale et al., 1996). La “enfermedad bacteriana del agua fría” ha sido detectada en la mayoría de las

especies de salmónidos en cultivo (Dalsgaard 1993; Austin & Austin 1993). *F. psychrophilum* ha sido descrito como el agente causal de la “enfermedad o Síndrome del alevín de la trucha arco iris” (Crump et al. 2001). Inicialmente, se consideró que esta enfermedad se restringía al norte del continente americano, pero desde finales de la década de los años 80 se sabe que tiene una distribución mundial que abarca Alemania (Weis 1987), Francia (Bernardet et al., 1988), Dinamarca (Dalsgaard & Horlyck 1990), Reino Unido (Santos et al. 1992), España (Toranzo & Barja 1993), Finlandia (Wiklund et al. 1994), Japón (Wakabayashi et al. 1991) y Chile (Bustos et al. 1995). En la actualidad es probable que la bacteria esté ampliamente diseminada a través del mundo (Ekman, 2003; Cipriano & Holt 2005).

La enfermedad producida por *F. columnare* (*columnarosis*), fue inicialmente descrita por Wolke en 1975. Esta condición fue definida como necrosis epidérmica de peces salmónidos y de acuarios con ulceración subsecuente con posible daño y destrucción de agallas. Los hallazgos macroscópicos consistieron en manchas claras ovales en diferentes partes de la superficie corporal. Su localización puede variar de una especie hospedera a otra, de tal manera que los peces con escamas, están siendo invadidos frecuentemente en aletas y agallas. Un signo típico es una necrosis en forma de silla de montar con pérdida sustancial de la piel entre la aleta dorsal y de la cola (Wolke, 1975).

2.1.1.1 Signos clínicos de la *Columnarosis* (*F. columnae*)

Los peces infectados con *F. columnae*, suelen presentar lesiones ulcerosas de color amarillo-café en las branquias y aletas. Las bacterias se adhieren en la superficie de las branquias, crecen en forma de parches que se expanden y eventualmente cubren los filamentos individuales de las branquias, produciendo muerte celular. Estas porciones de las branquias, son degradadas por enzimas producidas por las bacterias que infectan (Robert et al, 1998).

Las lesiones en piel producidas por la *columnarosis*, son inicialmente muy superficiales y tienen la apariencia de áreas que han perdido la brillantez en la piel. Las lesiones más avanzadas, pueden ser redondas u ovaladas de color amarillo-café con una úlcera abierta en el centro. Una lesión característica, es una banda blanca y pálida que envuelve el cuerpo del animal, conocida como “silla de montar”. A medida que la infección progresa, se observa

una úlcera de color amarillo-café en el centro de la silla. Adicionalmente, no es inusual encontrar un crecimiento de tipo mucoso de color amarillo-café en la boca del pez, el cual es rico en bacterias (*F. columnae*) (Robert et al, 1998).

El *F. columnare* puede ser aislado de los órganos internos de los peces. No existen signos clínicos característicos de estas infecciones internas, pero puede haber inflamación del riñón posterior (Robert et al, 1998).

2.1.1.2 Signos clínicos de la enfermedad de las aguas frías (*F. psychrophilum*)

En un estudio llevado a cabo en el Perú, se describió las lesiones y signos clínicos de la enfermedad de las aguas frías causada por *F. psychrophilum*. En este estudio, los animales enfermos presentaron macroscópicamente cuadros patológicos muy evidentes de erosiones o ulceraciones severas y muy profundas que afectaban la piel, músculo, aleta dorsal y región del pedúnculo caudal del huésped a manera de “silla de montar”. En general, los alevines afectados se mostraron con un cuadro de lesiones propias de una infección aguda o sub-aguda, siendo común la observación de lesiones macroscópicas evidentes y frecuentes como el ennegrecimiento local de la piel, distensión abdominal y ocasionalmente exoftalmia (Leon et al, 2009).

Otras características adicionales fueron la letargia, la inapetencia, natación errática y/o permanencia casi siempre aislado cerca de la salida del agua. muestra los signos clínicos más relevantes que afectan a los órganos internos como: esplenomegalia, palidez del hígado, riñón y branquias; inflamación del intestino y acumulación del líquido ascítico en el peritoneo. No se detectó hemorragias externas ni internas (León et al, 2009).

Los signos clínicos de la flavobacteriosis en salmónidos, así como la mortalidad dependen del tamaño de los peces afectados. Sin embargo, *F. psychrophilum* se caracteriza por causar infecciones agudas principalmente en alevinos, caracterizados por una marcada erosión dorsal y/o peduncular acompañada de una pigmentación oscura, además por causar mortandad hasta 50% de la población afectada (Holt et al. 1993).

En un cuadro de infección externa o sistémica el patógeno principal generalmente es asociado con otras bacterias principalmente Gram negativas como *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y otros (Padrós y Furones 2002).

Los signos externos de la enfermedad no tienen gran valor para diagnosticar al patógeno *F. psychrophilum*, porque son similares a los observados en peces afectados por otras enfermedades como la “columnarosis” (bacteriana) y la Necrosis Pancreática Infecciosa (viral) (Leon *et al*, 2009).

2.1.1.3 Diagnóstico de enfermedades bacterianas en truchas

2.1.1.3.1 Diagnóstico por cultivo para *flavobacterias*

Los cultivos bacterianos para la identificación de *flavobacterias*, se realizan a través de disecciones asépticas de los peces para obtener muestras de líquido ascítico del peritoneo, forúnculos, raspado de las ulceraciones cutáneas, maceración de órganos internos (bazo, hígado, riñón) y agallas; los cuales pueden ser sembradas en el Agar Cytophaga Modificado según Anaker & Ordal (AOA) (1959) (triptona 0,5%; acetato de sodio 0,02%; extracto de levadura 0,05%, extracto de carne 0,05% y agar 1,5%) y Agar Tripticasa Soya (TSA). Paralelamente se debe preparar láminas para la observación directa en “gota pendiente” y frotis para la coloración Gram. Los cultivos se deben incubar a 20 °C por 48 a 96 horas (Leon *et al*, 2009).

Para observar la sensibilidad a diferentes antibióticos, se comienza con las colonias que han crecido entre las 48—72 horas, se prepara una suspensión con una concentración equivalente al tubo 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) y se siembra mediante una tórula en TSA y AOA. Se utilizan sensidiscos con los antibióticos: bacitracina (10 µg), norfloxacino (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), ácido nalidixico (30 µg), penicilina (10 U), gentamicina (10 µg), ceftazidina (30 µg), furazolidona (100 µg), oxitetraciclina (30 µg) y sulfatrimetoprim (25 µg). Se incuban por 5 días a 20 °C (Leon *et al*, 2009).

2.1.1.3.2 Diagnóstico molecular y serológico para infecciones bacterianas en truchas

Actualmente, los análisis serológicos tipo aglutinación son de gran utilidad para el diagnóstico confirmativo de la enfermedad del agua fría, así como ensayos de anticuerpos fluorescentes (Holt 1994), pero se ha determinado la existencia de reacciones cruzadas con otras bacterias filamentosas como *F. columnaris* u otros grupos bacterianos (Faruk et al. 2002; Mata et al. 2002). Actualmente para muestras de campo existen varios métodos de identificación todos basados en técnicas moleculares como PCR y RFLP (Baliarda et al. 2002).

Altinok et al, 2008, probaron una PCR multiplex, que sirve para el diagnóstico de diferentes infecciones bacterianas en truchas, entre ellas las infecciones por *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, *F. columnare*, *Renibacterium salmoninarum* y *Yersinia ruckeri*. Esta PCR multiplex, tuvo un límite de detección entre 1-3 UFC (Unidades Formadoras de Colonia) entre las diferentes especies de bacterias. Además, no presentó ninguna inespecificidad cuando se probó con *Aeromonas sobria* (AL94232 and AL9425), *A. veroni* (AL0548), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Edwardsiella tarda* (AU0338 and A19938), *E. ictaluri* (ATCC 33202, AL9549, AU9828, and AU9738), *Enterobacter faecalis* (ATCC 2942), *Escherichia coli* (NCTC 12900), *Hafnia alvei* (TSUR0702), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas fluorescens* (AU9233, AU9738, AU9833), *Plesiomonas shigelloides* (AL9354 and AL98051), *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Streptococcus aureus* (ATCC 25923), *Vibrio fluvialis* (CECT 4217), *Vibrio alginolyticus* (CECT 52), *V. parahaemolyticus* (CECT 511), *V. mimicus* (CECT 4218), y *Yersinia pestis*.

También se ha utilizado la hibridación in situ y las micromatrices, como diagnóstico molecular de bacterias patógenas en truchas, estas técnicas han demostrado una buena sensibilidad y especificidad, pero se deben realizar en laboratorios con buena dotación de equipos de biología molecular (Altinok y Kurt, 2003).

2.1.1.4 Prevención, control y tratamiento de la infección por *Flavobacterium spp.*

En general la mejor manera de manejar las infecciones bacterianas en peces, es controlar los factores que pueden desencadenar la infección. Las infecciones por *F. sp.*, presentan variables intrínsecas en el agua que son factores de riesgo de la enfermedad, por ejemplo, la enfermedad del agua fría, así como el curso de la epizootia están profundamente influenciados por la temperatura del agua. Generalmente la enfermedad se manifiesta cuando del agua oscila entre 4 y 10 °C y sigue su curso hasta que la temperatura del agua alcanza los 13 °C. En este sentido, la temperatura del agua del lugar de estudio fue en promedio 10°C, el cual es ideal para el desarrollo del patógeno. Aunque temperaturas superiores normalmente conducen a la desaparición de la enfermedad (Holt et al., 1989) se han descrito epizootias a temperaturas del orden de 16 °C (Obach et al. 1995). A temperaturas superiores a 15 °C la mortalidad declina progresivamente hasta llegar cerca del 0% a 23 °C.

Además de la temperatura del agua existen otros factores ambientales desencadenantes de las epizootias como la irradiación solar directa a los alevines muy jóvenes, el estrés, la superpoblación y otros factores inherentes al pez (talla, estado inmunológico) que pueden condicionar la aparición y/o desarrollo de la enfermedad (Obach et al. 1995). A todo ello, se debe agregar la virulencia de la cepa bacteriana (Lorenzen et al. 1991; Bustos et al. 1995). Hasta el momento se han realizado pocos estudios con el fin de esclarecer los mecanismos de virulencia de *F. psychrophilum*. Las proteasas extracelulares podrían contribuir a la patogenicidad, ya que se ha demostrado que producen diferentes enzimas proteolíticas capaces de degradar gelatina, caseína, tirosina, elastina, fibrinógeno, colágeno y extracto de músculo que podrían causar lesiones en los tejidos o incrementar la capacidad invasiva de las cepas (Dalsgaard 1993).

Por otra parte, los brotes más graves de la enfermedad del agua fría se producen en alevines que aún no han reabsorbido el saco vitelino y por lo tanto no se alimentan mediante pienso (Nematollahi et al. 2003), lo que imposibilita su medicación a través de la dieta. La vacunación en esta etapa es inefectiva o confiere una protección limitada (Obach & Baudin-Laurencin, 1991). Por otra parte, la posible diversidad serológica de las cepas de *F. psychrophilum* debe ser tomada en cuenta en el desarrollo de una vacuna.

En Perú se realizó un estudio de sensibilidad de diversos antibióticos en 29 cepas de bacterias causantes de la enfermedad de las aguas frías. Dentro de los antibióticos utilizados la Gentamicina tuvo un 100% de sensibilidad, Ceftazidina (100%), oxitetraciclina (93,1%), Norfloxacin (93,1%), furazolidona (89,6%), Ciprofloxacina (75,8%) y Cefoxitina (75,8%) (Tabla 4). Asimismo, resultaron altamente resistentes frente a sulfatrimetoprim (100%), penicilina (96,5%), clindamicina (89,6%) y bacitracina (86,2%) (Leon *et al*, 2009).

El cloranfenicol fue el antibiótico más usado para el tratamiento de la enfermedad del agua fría, sin embargo, desde su prohibición la oxitetraciclina bajo diferentes prescripciones terapéuticas es la terapia más eficaz en la actualidad (Bruun *et al*, 2003). Generalmente, la enfermedad del agua fría es controlada por medios terapéuticos, aunque el constante uso de éstos ha provocado la aparición de cepas resistentes (Holt *et al*, 1993; Lorenzen, 1994; Obach *et al*, 1995).

2.1.2 Infecciones y Enfermedades Bacterianas en Tilapia

2.1.2.1 Signos clínicos de la enfermedad causada por *Streptococcus spp* en peces.

Streptococcus spp ha emergido como un importante patógeno en un gran número de centros de cultivo de peces. Entre las especies de *Streptococcus* se encuentran el *Streptococcus Agalactiae* aislado en 1986 en Israel de cultivos de peces (Truchas y tilapias). La enfermedad en tilapias causaba signos nerviosos y letargia, además de una septicemia. (Kohler, 2007). El *Streptococcus iniae*, fue aislado originalmente en 1976 (Pier y Madin, 1976), en delfines de agua dulce, recientemente fue asociado como potencial zoonótico con más de 25 casos confirmados (Facklam *et al*, 2005), en 1997 se estimó en los Estados Unidos de Norte América, unas pérdidas anuales causadas por esta bacteria en las industrias piscícolas de 10 millones de dólares y mundialmente de 100 millones de dólares. (Shoemaker *et al*, 2001).

En Colombia, las pérdidas que pueden ocasionar estas bacterias son bastante significativas si tenemos en cuenta que la producción total en sistemas de acuicultura alcanzó en 1996 las 30.000 ton, de las cuales las tilapias representan el 46% de la producción; pero el verdadero impacto es prácticamente desconocido debido fundamentalmente a la falta de un diagnóstico y cuantificación precisa de la enfermedad (Iregui *et al*, 2004).

El primero caso de la enfermedad en humanos por esta bacteria fue reportado en Texas en 1991, y un segundo caso se encontró en Ottawa en 1994 (Centers for Disease Control and Prevention, 1996). Durante el invierno de 1995 a 1996, se diagnosticaron cuatro casos de pacientes que presentaban celulitis aguda atribuida a un *Streptococcus viridans* (Weinstein et al., 1997), pero las pruebas diagnósticas demostraron que se trataba de un *Streptococcus iniae* y no de un *Streptococcus viridans*.

La característica común de estos pacientes fue que manipularon tilapias vivas o filetes frescos antes del comienzo de la enfermedad. Otros cinco casos se identificaron seguidamente en el mismo año en Canadá. Estos casos demuestran claramente, que este patógeno es capaz, no sólo de causar enfermedad seria en peces y sino que también es transferido a humanos a usando una enfermedad infecciosa de gravedad variable convirtiéndose en una verdadera zoonosis (Romano y Mejía, 2003).

2.1.2.2 Signos clínicos y hallazgos histopatológicos de la enfermedad causada por *Streptococcus* en peces.

Los *Streptococcus* tienden a causar diferentes estados de enfermedad en los peces. En los delfines de agua dulce la sintomatología clásica fue abscesos subcutáneos multifocales. (Pier y Madin, 1976). El *Streptococcus iniae* en peces puede causar una meningitis y panoftalmitis que resulta en altos índices de morbilidad y mortalidad (Bromage y Owens, 2002). Pero en general los signos clínicos más evidentes en las enfermedades causadas por *Streptococcus* son los siguientes: exoftalmia, opacidad corneal, melanosis, letargia, pérdida de orientación, nado errático, rigidez dorsal, deformidad vertebral (Eldar et al., 1994), uno de los grandes hallazgos son el edema intracraneal el cual puede generar la panoftalmitis hemorrágica. (Bromage y Owens, 2002).

La vía de entrada de las bacterias puede ser por vía oral, exposición cutánea del pez con o sin abrasión con el agua y experimentalmente en inyecciones intraperitoneales, además se sugiere que la vía de infección puede ser a través de vías olfatorias, por contacto directo con peces muertos infectados o por canibalismo de peces moribundos que se encuentran infectados (Bromage y Owens, 2002).

El análisis histológico muestra un característico cuadro septicémico con una marcada infiltración celular inflamatoria y numerosos cocos en la mayoría de los tejidos examinados. Predomina un cuadro meningoencefálico con dilatación de capilares meníngeos, extravasación de eritrocitos y densos infiltrados inflamatorios con predominio de granulocitos y macrófagos, aunque también se observan linfocitos. Con técnicas de impregnación argéntica se pueden ver abundantes cocos en el parénquima encefálico. En el hígado se observa una hepatitis focal intraséptica con focos de necrosis hepatocelular e infiltrados inflamatorios. En algunos casos se puede observar una periarteritis hepática. En el bazo se observa disgregación de melanomacrófagos y presencia de cocos en los sinusoides esplénicos. La miocarditis y la pericarditis suele ser un hallazgo frecuente. Algunos autores describen oftalmitis, presencia de granulomas meníngeos y focos inflamatorios renales (Perera *et al.*, 1998).

Todos estos signos y hallazgos histopatológicos han sido asociados a algunas variables medioambientales como lo es el incremento en la temperatura del agua (por encima de 17 °C). (Bercovier *et al.*, 1996). Además, se asocian con algunos factores fisicoquímicos del agua especialmente con aumento en el amonio, en nitratos y nitritos y bajos niveles de oxígeno disuelto. También el aumento en la densidad de animales y otros eventos estresantes contribuyen con estos factores. (Eldar *et al.*, 1995).

2.1.2.3 Diagnóstico de streptococcosis.

Los métodos diagnósticos son varios desde las técnicas bioquímicas bacteriológicas convencionales hasta técnicas moleculares. La identificación fenotípica del *S. iniae* requiere de un análisis bioquímico extenso. Como otros estreptococos, este organismo aparece como un coco en cadenas, Gram positivo, catalasa negativo y aminopeptidasa positivo, sensible a la vancomicina. Cuando el microorganismo se incuba en medios anaeróbicos se demuestra una clara actividad betahemolítica. La tipificación molecular se realiza por medio de PFGE (pulsed-field gel electrophoresis).

Los métodos para la identificación fenotípica preliminar de *Streptococcus iniae* han sido descritos en Canadá y desarrollados por el Center for Diseases Control and Prevention en 1995, pero para la exacta identificación se requiere una comprobación bioquímica extensa o métodos moleculares que generalmente sólo se encuentran disponible en los laboratorios considerados de referencia (Romano & Mejía, 2003).

La PCR ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico e identificación de patógenos en peces. Usando un fragmento de 1100 bp se logró distinguir *Lactococcus garvieae* de *Lactococcus lactis*, la detección se realizaba en 1 µl de plasma (Zlotlin *et al.*, 1998). León *et al.*, (1994) reportan que implementando una secuencia de DNA de 149 bp, fue sensible para detectar 22 células renibacteriales invariables en tejidos, y de suficientemente especificidad para reconocer *Ren salmoninarum* de otros 8 agentes patógenos. La amplificación de una región de 501 bp de un gen que codifica una proteína soluble (p47) de 57 Kda, esta forma es la base de una PCR que detecta dos células renibacteriales dentro ovas individuales de salmónidos (Brown *et al.*, 1994). Esta PCR fue considerada de tener valor para certificar zonas de incubación de la presencia de BKD. Høje *et al.* (1997) diseñaron primera y sondas desde rRNA 16S y plásmidos DNA, los cuales les permitieron diferenciar especie y subespecies de *Aeromonas*. Basados en el análisis de 100 ml de suspendido de riñón y branquias, la PCR detectó 20 y 200 UFC en 10 µl de templado de PCR de 16S rRNA y plásmidos DNA, respectivamente. El número corresponde a 10^3 y 10^4 UFC en 100ml de suspendido de riñón.

2.1.2.4 Prevención y Terapia

La mayoría de las infecciones dérmicas con *Streptococcus* responden a una terapia con beta-lactámicos (Penicilina) en el curso de unos 10 días. (Pier y Madin, 1976). Sin embargo, las tetraciclinas (oxitetraciclina, 82.7 mg/Kg por 10 días) y las quinolonas (enrofloxacin, 5 – 10 mg/Kg por 10 días) han tenido buenos resultados. (Stoffregen *et al.* 1996 y Darwish and Ismaiel, 2003).

Fuller *et al.*, 2001, afirma que la mejor estrategia, como casi siempre sucede, es la vacunación apropiada de los animales. Cuando se menciona el uso apropiado, se está refiriendo al uso de la vacuna específica. Por lo tanto, hay que proceder a una buena identificación del

microorganismo ya que existen diferentes cepas y diferente virulencia asociada a cada genotipo de *S. iniae* identificado (Fuller *et al.*, 2001). Es por eso que algunas vacunas parecen no tener éxito, se debe tener en cuenta que el sistema inmunológico de los peces es muy similar al de los mamíferos y que el reconocimiento en la fase específica de la respuesta inmune, sea ésta celular u humoral, es antígeno dependiente, o sea, sólo se responde al determinante antigénico del antígeno presentado por las células presentadoras de antígenos (Bachrach *et al.*, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Criterios de inclusión y exclusión

- Criterios de inclusión: Los centros de producción de trucha y tilapia que estuvieran registrados en las bases de datos departamentales enfocados a producción piscícola.
- Criterios de exclusión: Centros de producción que no contaran con todos los registros de producción, de mortalidad, concesión de aguas, permisos de cultivo y comercialización pertenecientes al departamento de Antioquia.

Área de estudio

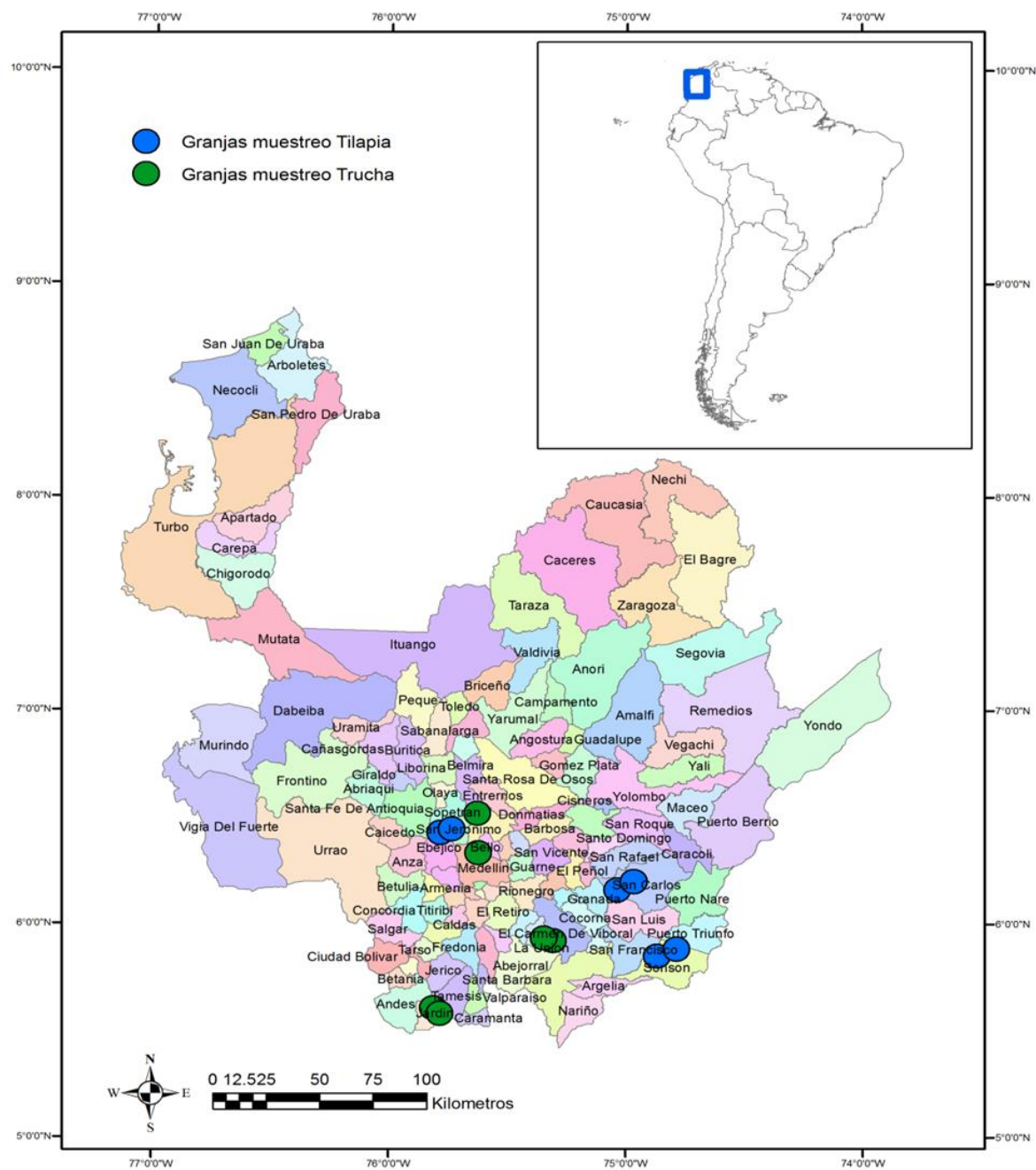
El proyecto es llevado a cabo en el Departamento de Antioquia, abarcando producciones de tilapia en el norte y occidente, además de producciones de trucha en el suroeste y oriente.

La población de estudio es conformada por 12 centros de producción, 6 pertenecientes a trucha arcoíris y 6 sistemas de producción de tilapia localizadas en las diferentes subregiones del departamento de Antioquia. (Ver Tabla 2 y Mapa 1)

Tabla 2. Ubicación de los sistemas de Producción.

| Subregión | Municipio | Sistema de producción | Granja | Geo-referenciación |
|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Oriente | La unión | Trucha Arcoíris | San Miguel | 5° 55' 19'' N – 75° 18' 26'' W |
| | | Trucha Arcoíris | Arco Azul | 5° 55' 19'' N – 75° 20' 46'' W |
| | San carlos | Tilapia | Raybe | 6° 16' 1'' N – 75° 2' 5'' W |
| | | Tilapia | La palma | 6° 11' 55'' N – 74° 57' 57'' W |
| | San Francisco | Tilapia | El Rosario | 5° 51' 9'' N – 75° 52' 3'' W |
| Occidente | San Jeronimo | Tilapia | El Politecnico | 6° 26' 39'' N – 75° 44' 9'' W |
| | Sopetrán | Tilapia | El Gaitero | 6° 25' 43'' N – 75° 47' 5'' W |
| Valle de aburra | Corregimiento de Bello | Trucha Arcoíris | Piscícola del occidente | 6° 19' 56'' N – 75° 37' 26'' W |
| Suroeste | Jardin | Trucha Arcoíris | La truchería | 5° 34' 55'' N – 75° 47' 7'' W |
| | | Trucha Arcoíris | Truchas del Jardín | 5° 36' 21'' N – 75° 48' 50'' W |
| Norte | Belmira | Trucha Arcoíris | La Juaquina | 6° 31' 1'' N – 75° 37' 38'' W |
| Magdalena medio | Puerto Triunfo | Tilapia | El doradal | 5° 55' 07'' N – 74° 47' 37'' W |

Mapa 2. Ubicación centros de producción de tilapia y trucha en el Departamento de Antioquia.



3.2 Procedimiento de toma de muestras

Previamente se realizaba una aleatorización a los estanques de cada piscícola con un requerimiento de 24 horas de ayuno previamente a la toma de muestras. En cada uno de los centros visitados se instaló el laboratorio móvil, con el objetivo de aislar la zona de toma de muestras del medio ambiente para evitar contaminaciones cruzadas.

Los animales muestreados se anestesiaban con MS-222 (1gr / 50Lts) a dosis letal para evitar stress que provoque alteraciones en los órganos, se procede con la limpieza exterior de los peces usando desinfectante, se registra el peso, la talla y las observaciones clínicas externas. Se continua con la disección según el protocolo establecido para tomar las muestras de microbiología, histopatología y molecular (Ver Tabla 2)

Tabla 3. Protocolo de Toma de Muestras.

| Protocolo de toma de muestras | |
|--------------------------------------|---|
| 1. | Colocar el pez en decúbito lateral derecho dentro de la cabina de muestreo y encima del individual. |
| 2. | Tomar nota de anomalía externas |
| 3. | Limpiar la mucosidad excesiva con toallas de papel. |
| 4. | Iniciar una incisión abdominal antes de la papila anal hasta el extremo inferior del opérculo y otra por la línea longitudinal media, hasta el borde de las branquias. |
| 5. | Abrir y tomar las muestras microbiológicas con un hisopo estéril y sembrar en los agares respectivos, realizando estrías hasta la mitad del medio y terminar con el hisopo en el caldo correspondiente. |
| 6. | Finalizar con el almacenamiento de los agares y caldos en una nevera de icopor con pilas refrigerantes. |
| 7. | Marcar adecuadamente las cajas de los medios con el código correspondiente. |
| 8. | Luego evaluar el aspecto macroscópico de las vísceras y tomar fotos al encontrar anomalías. |

9. Tomar los órganos internos (Riñón, Bazo, Hígado, Cerebro, corazón) y sacarlos para cortar en trozos pequeños que puedan ser luego procesados para extracción de DNA.
10. Se realiza un pool de órganos y se llevan a un criovial con etanol
11. Luego se toma un fragmento pequeño de cada órgano y se llevan a un criovial con etanol.
12. Se finaliza con el marcaje correspondiente de cada muestra.
13. Luego fuera de la cabina se inicia el proceso de toma de muestras para histopatología.
14. Se llevan los órganos a una superficie plana para realizar cortes de pequeños segmentos. (corazón, las branquias, el cerebro, el bazo, el hígado, el riñón).
15. Luego se llevan a un falcon de 50 ml debidamente marcado que contiene formol bufferado al 3,7 %.
16. Al finalizar el procedimiento descartar el individuo en bolsas rojas.

Las muestras tomadas eran posteriormente llevadas a los diferentes laboratorios para sus respectivos análisis

3.2.1 Salidas de campo y manejo de muestras.

Los muestreos en los diferentes predios se realizaron mensuales durante 24 meses, en el desarrollo de estas visitas se registraron los datos físicos-químicos del agua y se procedió a tomar muestras aleatoriamente de estanques y animales. En el caso particular de animales vivos, se anestesiaron con MS-222 (1gr / 50Lts) y se sacrificaron para posteriormente realizar la necropsia y la toma de muestras de tejido e hisopados de cada órgano (Imagen 1)



Ilustración 1. Laboratorio móvil para salidas de campo.

3.2.2 Registro de parámetros morfométricos. (Imagen 2)

A todos los individuos colectados se les registraron datos morfométricos que fueron: (peso, longitud), sexo (macho, hembra) y la especie (*O. spp*, *O. niloticus* y *O. mykiss*).

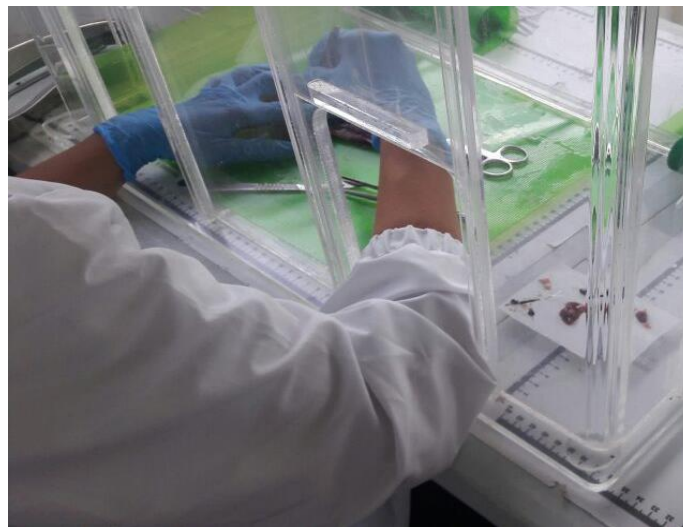


Ilustración 2. Registros Morfometricos.

3.2.3 Registro de variables ambientales (Imagen 3)

Los valores de temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (%), los cuales son registrados todos los días con un intervalo de 3 horas. Estos son promediados y se determinan su variación durante cada periodo del estudio. Para la precipitación o pluviosidad (mm^3) se tomaron el valor acumulado por periodo. La información será colectada de estaciones meteorológicas WS-1516-IT “Weather Channel de La Crosse Technolog” (imagen 3)



Ilustración 3. Estaciones meteorológicas WS - 1516 – IT

3.2.4 Registro físico-químico del agua

Durante las salidas de campo se monitorearon las variables físico-químicas del agua implementando el multiparámetro modelo YSI556 (Imagen 4), específicamente: Oxígeno disuelto, concentración de nitritos y nitratos, amonio, dióxido de carbono, pH, temperatura y conductividad.



Ilustración 4. Multiparametro Modelo YS1556

3.2.5 Examen histopatología para truchas y tilapias.

Se tomaron muestras de tejidos como cerebro, hepatopáncreas, hígado, bazo, branquias y lesiones en piel, estos son retirados del animal durante la necropsia (Imagen 5), y una parte es conservada en formol tamponado al 10%, en PBS (*phosphate buffer saline*) como método de rutina para fijar y conservar los tejidos sin afectar la citoarquitectura (Rodríguez, 1992).

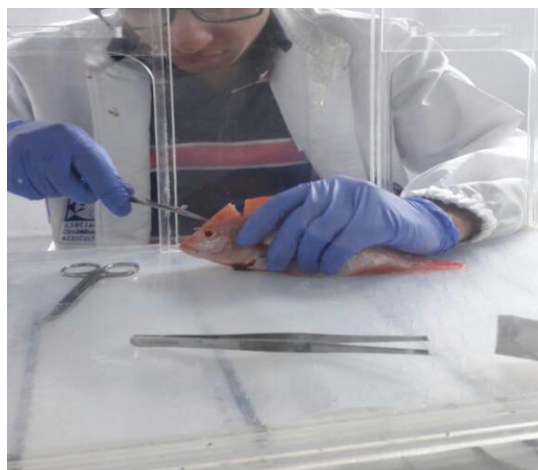


Ilustración 5. Necropsia para retirar órganos de interés.



Ilustración 6. Procesador de tejidos de la U. Antioquia.

Luego en el laboratorio de Histopatología animal de la Universidad de Antioquia, se saca una pequeña porción representativa de la muestra y se lleva al procesador automático de tejidos (Imagen 6), en esta fase se da la inclusión del tejido con parafina y consiste en: deshidratación, aclaración, infiltración y colado de bloques donde el tejido quedará incluido (Imagen 7).



Ilustración 7. Tejido incluido en parafina


Se seccionarán los bloques con ayuda de un micrótopo (6 - 8 μ espesor) y se pondrán en baño de flotación para selección de las muestras donde se monta en placas de vidrio para coloración general de rutina con hematoxilina- eosina (H&E) o tinción para Gram, las cuales


son implementadas para el análisis de las secciones histológicas, posteriormente se llevarán las muestras para observación en microscopía (10x y 40x). (Imagen 8)



Ilustración 8. Tejido de los diferentes órganos de interés fijado y coloreado con hematoxilina - eosina.

Tabla 4. Resultado Histopatológico de Flavobacterium positivo a PCR.

| | | | |
|---|--|--|-----------------|
| Código: F-UD-002P - Versión: 03 - Fecha de aprobación: 06/05/2016 | | | |
|  | | FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS UNIDAD DE DIAGNÓSTICO LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANIMAL | |
| INFORME DE RESULTADOS | | | |
| Nº Caso | 16-1535 | | |
| Análisis solicitado | | Método | |
| Análisis histopatológico | | Inclusión de tejidos en parafina y coloración hematoxilina – eosina | |
| Médico Veterinario: | Cristian Cantor | ID del paciente: | II TR 039 |
| Tarjeta Profesional: | 24136 | HC: | NR |
| Correo: | criscantorher@yahoo.com | Especie: | NR |
| Tel: | NR | Raza: | Trucha Arcoíris |
| Clínica o Institución: | ASOACUICOLA | Sexo: | Hembra |
| Propietario: | ASOACUICOLA | Edad: | NR |
| Correo: | NR | Nº de muestras: | NR |
| | | Dirección de residencia del paciente: | NR |
| Fecha toma de muestra | Fecha emisión de resultado | | |

| | |
|--|-----------------|
| 09/06/2016 | 08/12/2016 |
| DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA | |
| <p>Branquia: Hiperplasia y fusión lamelar. Congestión severa de filamento primario y moderado en lamelas. Infiltración leucocitaria severa de lamelas por infiltración leucocitaria mixta severa hacia la base de la lamela. Evidencia de colonias bacterianas en varias lamelas.</p> <p>Bazo: Congestión severa de pulpa roja, MM abundantes en vasos esplénicos. Infiltrado leucocitario moderado asociado a pulpa roja. Depleción de pulpa roja.</p> <p>Cerebro: Vacuolización severa de neurópilo. Infiltrado leucocitario leve asociado con meninges. Gliosis moderada. Edema y congestión moderada de encéfalo.</p> <p>Riñón: Focos de necrosis glomerular y tubular. Infiltración leucocitaria (granulocitos en intersticio renal)</p> <p>Hepatopáncreas: Sin alteraciones evidentes. Evidencia de esteatosis macrovacuolar.</p> <p>Corazón: Focos amplios de pericarditis y miocarditis (infiltrado mixto moderado) con necrosis de miocitos adyacentes.</p> | |
| DIAGNÓSTICO | |
| <p>Branquia: Branquitis.</p> <p>Bazo: Esplenitis</p> <p>Cerebro: Meningitis.</p> <p>Riñón: Nefritis.</p> <p>Corazón: Pericarditis y miocarditis.</p> <p>Hepatopáncreas: Ver descripción.</p> | |
| OBSERVACIONES | |
| Ninguna. | |
| <p>Nota:</p> <ul style="list-style-type: none"> - El procedimiento de toma de muestra es realizado por el usuario. - Los resultados reportados están relacionados sólo con la muestra sometida al ensayo. - Este informe no deberá reproducirse parcial o totalmente, salvo que se realice con la aprobación del laboratorio. | |
| <p>Visto por:</p>  <p>Diego A. Aranzazu Taborda. Reg: 43733</p> | |
| Cargo: | Patólogo |
| <p>Laboratorio de Patología, Tel: 2199124, Correo: laboratoriopatologiaudfca@udea.edu.co, Horario de Atención: L-J 8am-12pm y 2pm-6pm V 8am-12pm y 1pm-5pm Ciudadela Robledo Cra. 75 # 65-87, Medellín-Colombia, Bloque 47 of. 134</p> | |

Fuente: Laboratorio de Patología, Tel: 2199124, Correo: laboratoriopatologiaudfca@udea.edu.co.

3.2.6 Examen Bacteriológico de tejidos para *Streptococcus sp.*

Se toman isopados de los diferentes tejidos tanto de animales adultos, alevinos, carne y filetes, estos son cultivados en agar de soya con 5% de sangre de oveja e incubadas a 30°C por 48 hr. Donde se evalúan diversos aspectos para identificar el género *Streptococcus* en el cultivo. También se podrá evaluar la morfología de la colonia, tinción gram en los cultivos y observaciones bajo microscopio de luz, siguiendo la metodología propuesta por (Russo *et al.*, 2006).

3.2.7 Examen Bacteriológico de tejidos para *Flavobacterias sp*

Con el fin de aislar al patógeno se realizó disecciones asépticas de los peces para obtener muestras de líquido ascítico del peritoneo, forúnculos, raspado de las ulceraciones cutáneas, maceración de órganos internos (bazo, hígado, riñón) y agallas (Imagen 9); las cuales fueron sembradas en el Agar Cytophaga Modificado según Anaker & Ordal (AOA) (1959) (triptona 0,5%; acetato de sodio 0,02%; extracto de levadura 0,05%, extracto de carne 0,05% y agar 1,5%) y Agar Tripticasa Soya (TSA). Paralelamente se prepararán láminas para la observación directa en “gota pendiente” y frotis para la coloración Gram. Los cultivos serán incubados a 20 °C por 48 a 96 horas.

Para tener controles positivos de la prueba molecular, se contó con cepas de referencia (ATCC) de los *S. agalactiae* y *S. iniae* para los análisis en tilapia. Para los análisis en truchas, se contará con cepas (ATCC) de *F. columnae* y *F. psychrophilum*. Estas cepas se les hará un repique para tenerlas cultivadas y mantenidas en condiciones de congelación (-20 °C) y tener como realizar la estandarización de estas pruebas.



Ilustración 8. Toma aséptica de muestras para cultivo.

3.2.8 Extracción de DNA, a partir de tejidos y lesiones

Los tejidos fueron transportados en Nitrógeno líquido (-196°C) al laboratorio de biología molecular de la universidad CES (Imagen 10). Allí las muestras de Cerebro, hepatopáncreas, hígado, bazo, branquias y lesiones en piel, son partidas a la mitad y almacenadas una parte a -20°C y la otra parte a -80°C , luego se tomaron las muestras que están a -20°C y se descongelaron para la extracción de DNA.



Ilustración 9. Laboratorio de biología molecular de la U. CES.

Esta muestra de tejido se pesa (10-20mg), se le añade 200 μl de “Tissue Lysis buffer” (ATL), y se macerara utilizando el mortero con Bibortex, siempre dentro del tubo vial (eppendorf). Se añade 20 μl de proteinasa K y se mezcla con vórtex (Imagen11), e incuba a 56°C por 3 horas.



Ilustración 10. Mezcla de la muestra con Vortex.

Luego se centrifuga brevemente el tubo para precipitar las gotas que puedan estar adheridas a la tapa del vial (eppendorf), después se añade 200 μ l del segundo buffer de lisis (buffer AL) (Imagen 12). Se mezcla inmediatamente en vórtex. Luego se incuba a 70°C por 10min. Se añade 200 μ l de etanol al 100 % y se mezcla suavemente por inversión.

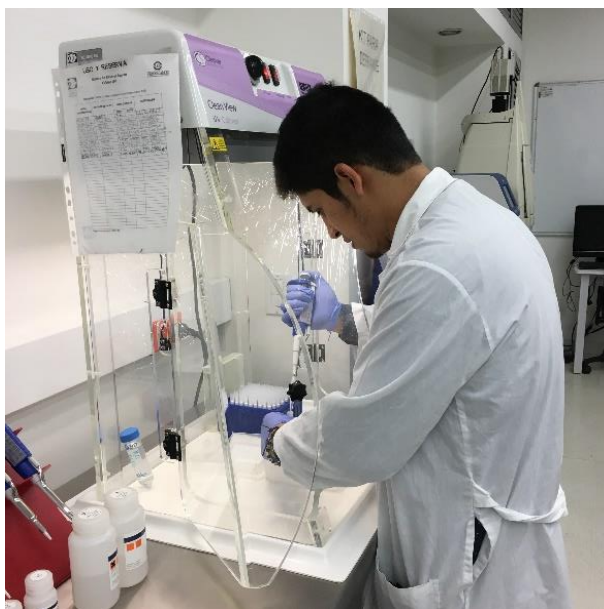


Ilustración 11. Adición de buffers de lisis.

Se centrifuga brevemente el tubo para precipitar el material no digerido. El sobrenadante es transferido al reservorio superior de un tubo que contenga una columna de unión (QIAamp DNA mini Kit, Qiagen) (Imagen 13). Se sigue el protocolo recomendado por las columnas de extracción (ANEXO). El líquido obtenido al fondo del tubo recolector se suspende en 50-200 μ l, dependiendo de las concentraciones que se estén obteniendo, el DNA se alicuotará y unas muestras se mantienen a 4 °C para su posterior análisis, la otra parte de las muestras se mantienen a -20 °C.



Ilustración 12. Columna de union (QIAamp DNA mini Kit, Qiagen)

Las concentraciones del DNA extraído se medirán con un equipo Fluorometro Qubit, Invitrogen. La pureza del DNA se hará mediante la estimación de las relaciones 260/280 y la 230/260 que se mide mediante un Nanodrop. (Imagen 14)

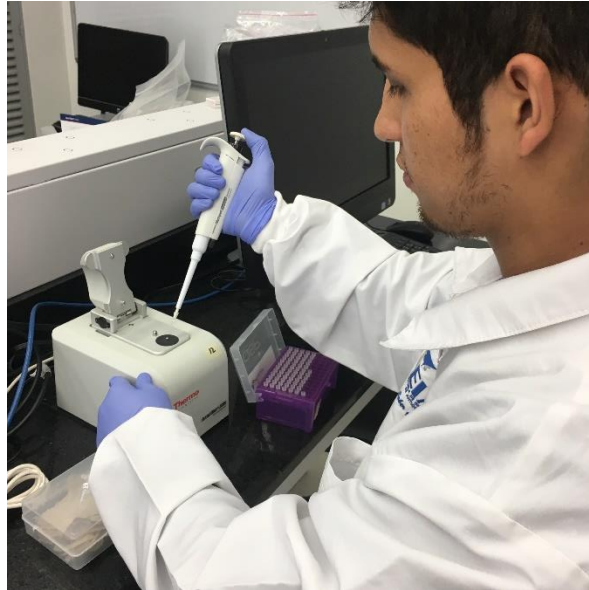


Ilustración 13. Medición de purea de ADN.

3.2.8.1 Protocolo de extracción de DNA en tejido para detección de bacterias manualmente.

Objetivo: Extracción de DNA bacteriano a partir de tejido

Materiales y equipos

- | | |
|------------------------------------|----------------------------|
| - Guantes | - Toallas de papel |
| - Bata de laboratorio | - Cuchillas de bisturí |
| - Pipetas de 1000 μ l y puntas | - Mangos para bisturí |
| - Pipetas de 200 μ l y puntas | - Pesa |
| - Viales de 1.5 μ l | - Plancha de calentamiento |
| - Rack para tubos | - Centrífuga |
| - Papel de aluminio | - Vortex |
| - Recipiente para descarte | |

Tabla 5. Preparación de Buffer enzimático.

| Reactivos | Peso molecular | Concentración | Observaciones |
|-------------------|----------------|---------------|------------------------------------|
| Tris- HCl pH: 8.0 | 157.6 g | 20Mm | |
| EDTA | 372.26 g | 2Mm | |
| TRITON X-100 | | 1.2% | |
| Lisozima | | 20 mg/ ml | Adicionar solo antes de extracción |

Cálculos

| |
|--|
| Tris-HCl $157.6 \text{ g tris HCl} / 1 \text{ mol} * 1 \text{ mol} / 1000\text{mM} * 20\text{mM} = \mathbf{3.152\text{g /L}}$ Para 50 ml $3.152\text{g} / 1000\text{ml} * 50 \text{ ml} = \mathbf{0.1576 \text{ g tris HCl}}$ |
| EDTA $372.26 \text{ g EDTA} / 1\text{mol} * 1 \text{ mol} / 1000\text{mM} * 2\text{mM} = \mathbf{0.744\text{g/L}}$ Para 50 ml $0.744\text{g} / 1000\text{ml} * 50\text{ml} = \mathbf{0.0372\text{g EDTA}}$ |
| Triton x- 100 Para 50 ml $v/v = 1.2 \% / 100\text{ml} * 50\text{ml} = \mathbf{0.6 \text{ ml ósea } 600\mu\text{l}}$ |

Procedimiento

1. Cortar y pesar 18 - 25 mg de tejido (10 mg para bazo) en pequeños trozos en viales de 1.5 ml.
2. Adicionar 180 µl de Buffer enzimático.
3. Incubar por 30 min a 37°C.
4. Adicionar 25 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer AL.
5. Dar vortex.
6. Incubar por 30 min a 56 °C
7. Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) mezclar bien la muestra y dar vortex.
8. La mezcla llevarla a un tubo de colección DNeasy Mini de 2ml
9. Centrifugar a 6000g (8000 rpm) por 1 minuto.

10. Descartar el sobrenadante y el tubo de colección.
11. Ubicar la columna en un nuevo tubo de colección de 2 ml y adicionar 500 µl de buffer AW1.
12. Centrifugar a 6000g (8000 rpm) por 1 minuto y descartar sobrenadante y tubo de colección.
13. Poner la columna en un nuevo tubo de 2ml y adicionar 500 µl de buffer AW2
14. Centrifugar a 20000 x g (14000rpm) por 3 minutos (La membrana debe estar completamente seca) y descartar sobrenadante y tubo de colección.
15. Tomar la columna y ubicarla en un vial de 1.5 limpio.
16. Añadir 100 µl de AE directamente a la membrana y centrifugar a 6000x g (8000rpm) por 1 min.
17. Añadir nuevamente 100 µl de AE directamente a la membrana y centrifugar a 6000x g (8000rpm) por 1 min.
18. Descartar la columna y marcar adecuadamente la muestra y finalmente almacenar a -20 °C.

Objetivo: Extracción de DNA bacteriano a partir de Muestra diluida en solvente en una concentración de 10^5 UFC/ml

Materiales y equipos

- | | |
|-------------------------------|----------------------------|
| - Guantes | - Recipiente para descarte |
| - Bata de laboratorio | - Toallas de papel |
| - Pipetas de 1000 µl y puntas | - Plancha de calentamiento |
| - Pipetas de 200 µl y puntas | - Centrífuga |
| - Viales de 1.5 µl | - Vortex |
| - Rack para tubos | |

Tabla 6. Preparación de Buffer Enzimático

| Reactivos | Peso molecular | Concentración | Observaciones |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Tris- HCl pH: 8.0 | 157.6 g | 20mM | |
| EDTA | 372.26 g | 2Mm | |
| TRITON X-100 | | 1.2% | |
| Lisozima | | 20 mg/ ml | Adicionar solo antes de extracción |

Cálculos

| |
|---|
| Tris-HCl $157.6 \text{ g tris HCl} / 1 \text{ mol} * 1 \text{ mol} / 1000\text{mM} * 20\text{mM} = \mathbf{3.152\text{g/L}}$ Para 50 ml $3.152\text{g} / 1000\text{ml} * 50 \text{ ml} = \mathbf{0.1576 \text{ g tris HCl}}$ |
| EDTA $372.26 \text{ g EDTA} / 1\text{mol} * 1 \text{ mol} / 1000\text{mM} * 2\text{mM} = \mathbf{0.744\text{g/L}}$ Para 50 ml $0.744\text{g} / 1000\text{ml} * 50\text{ml} = \mathbf{0.0372\text{g EDTA}}$ |
| Triton x- 100 Para 50 ml $v/v = 1.2 \% / 100\text{ml} * 50\text{ml} = \mathbf{0.6 \text{ ml ósea } 600\mu\text{l}}$ |

Procedimiento

1. Tomar 750 µl de la cepa concentrada al 10^8 UFC/ml en un vial de 1.5 ml.
2. Centrifugar por 10 min a 5000 x g (7500rpm) y descartar sobrenadante.
3. Adicionar 180 µl de Buffer enzimático al pellet obtenido.
4. Incubar por 30 min a 37°C.
5. Adicionar 25 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer AL.
6. Dar vortex.
7. Incubar por 30 min a 56 °C
8. Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) mezclar bien la muestra y dar vortex.
9. La mezcla llevarla a un tubo de colección DNeasy Mini de 2ml
10. Centrifugar a 6000g (8000 rpm) por 1 minuto.

11. Descartar el sobrenadante y el tubo de colección.
12. Ubicar la columna en un nuevo tubo de colección de 2 ml y adicionar 500 µl de buffer AW1.
13. Centrifugar a 6000g (8000 rpm) por 1 minuto y descartar sobrenadante y tubo de colección.
14. Poner la columna en un nuevo tubo de 2ml y adicionar 500 µl de buffer AW2
15. Centrifugar a 20000 x g (14000rpm) por 3 minutos (La membrana debe estar completamente seca) y descartar sobrenadante y tubo de colección.
16. Tomar la columna y ubicarla en un vial de 1.5 limpio.
17. Añadir 100 µl de AE directamente a la membrana y centrifugar a 6000x g (8000rpm) por 1 min.
18. Añadir nuevamente 100 µl de AE directamente a la membrana y centrifugar a 6000x g (8000rpm) por 1 min.
19. Descartar la columna y marcar adecuadamente la muestra y finalmente almacenar a -20 °C.

3.2.9 Diagnóstico molecular por PCR en tiempo real y convencional para infecciones bacterianas en tilapia

Para la estandarización de la prueba diagnóstica molecular por PCR convencional y en tiempo real para las especies *S. agalactiae* y *S. iniae*, en primera instancia se diseñan los primers, los cuales se generarán sobre la fracción intergénica del 16S-23S del DNA como región de amplificación, utilizando el Software Primer Express 3.0 Applied Biosystems. Para la construcción de los primers se emplearán las accesiones No. AF064441 (*S. agalactiae* strain SA 66-07 16S ribosomal RNA gene and 16S- 23S ribosomal RNA intergenic spacer) y No. AF335572 (*S. iniae* strain ATCC29178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) reportadas en el Genbank.

3.2.10 Diagnóstico molecular por PCR en tiempo real y convencional para infecciones bacterianas en trucha.

Para la estandarización de la prueba diagnóstica molecular por PCR convencional y en tiempo real para las especies *F. columnare* y *F. psychrophilum* en primera instancia se diseñarán los primers, los cuales se generarán sobre el gen 16S ribosomal RNA de cada especie, utilizando el Software Primer Express 3.0 Applied Biosystems. Para la construcción de los primers se emplearán las accesiones No. JQ684924.1 (Uncultured *Flavobacterium* sp. clone R1-131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) reportadas en el Genbank.

3.2.11 Protocolo de PCR en tiempo real

La estandarización de las pruebas de PCR en tiempo real se realizan empleando en el equipo Real-Time PCR systems 7300 Applied Biosystem (Imagen 15), las condiciones de la PCR, reactivos moleculares y perfiles térmicos, son desarrollados bajo las recomendaciones hechas por la misma compañía, con ajustes realizados en el laboratorio por el grupo de investigadores. Los perfiles térmicos serán: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Los volúmenes de los reactivos serán en total 25 ul por reacción y se distribuirán así: 12.5 ul Taqman Universal PCR master mix(2X), 0.5 ul Taq man, 1.25 ul Primer F (10 uM), 1.25 ul Primer R (10 um), 1 ul DNA y 8.5 ul de agua libre de ribonucleasa.

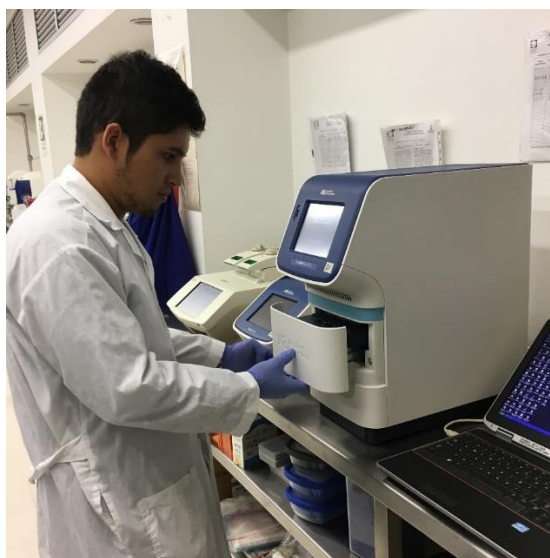
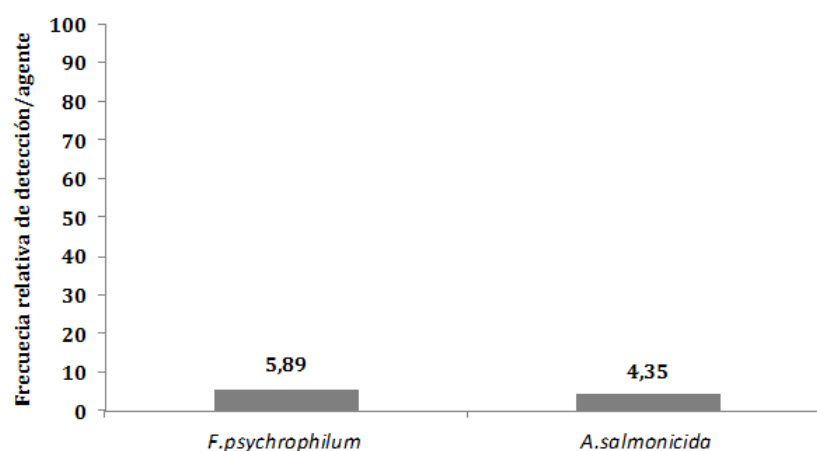


Ilustración 14. Programación del equipo Real-Time PCR systems 7300 Aplied Biosystem.

3.2.11.1 Análisis molecular (*Oncorhynchus mykiss*)

El análisis molecular permitió estimar la frecuencia de detección para *Flavobacterium psychrophilum* (5,89%) y *Aeromona salmonicida* (4,35%) para los centros de producción de trucha arcoíris en el Departamento de Antioquia. Ambos agentes están presentes en la mayoría de los centros de producción monitoreados en las diferentes subregiones, las prevalencias registradas son bajas, tipo endemia (Grafica 1, Imagen 16).



Grafica 1: frecuencia de detección de agentes bacterianos mediante PCR en Tiempo Real en centros de cultivos de trucha arcoíris en Antioquia.

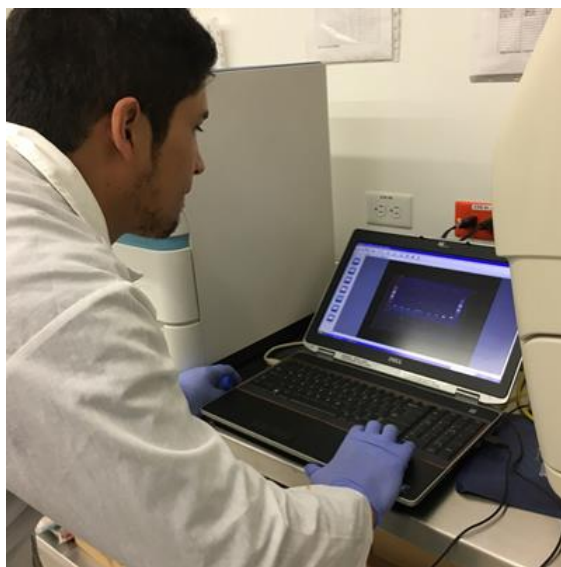


Ilustración 15. Interpretación de resultados por PCR en tiempo real.

La detección de *Flavobacterium psychrophilum*, tuvo lugar en todos los centros de producción, la frecuencia en los centros estuvo entre 3,08 y 9,23%, registrando los mayores valores para los centros A, B y C, ubicados en la Subregión Norte y Oriente. Los centros de la Subregión Suroeste (E y F) presenta valores bajos de detección del agente. (Grafica 2)

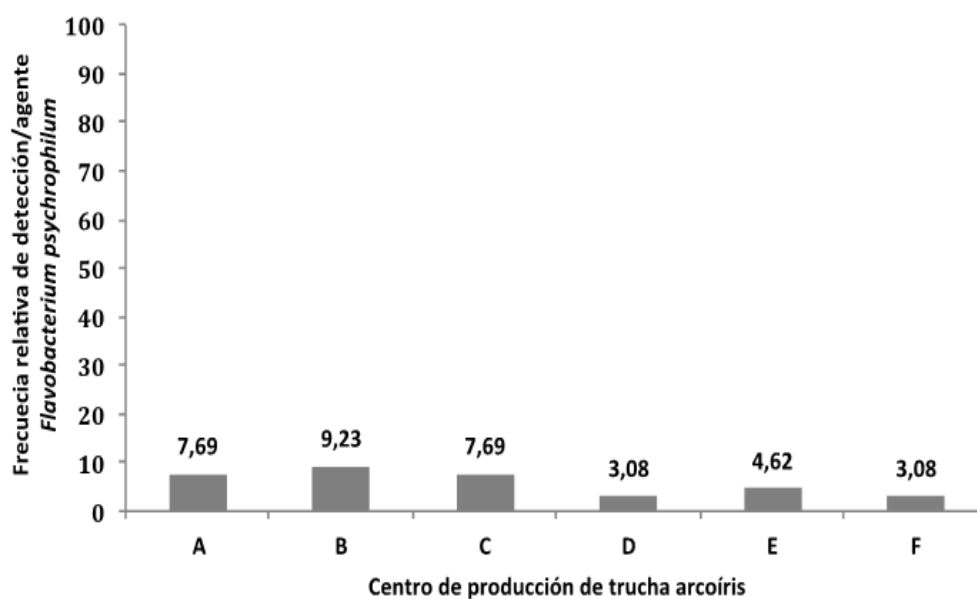
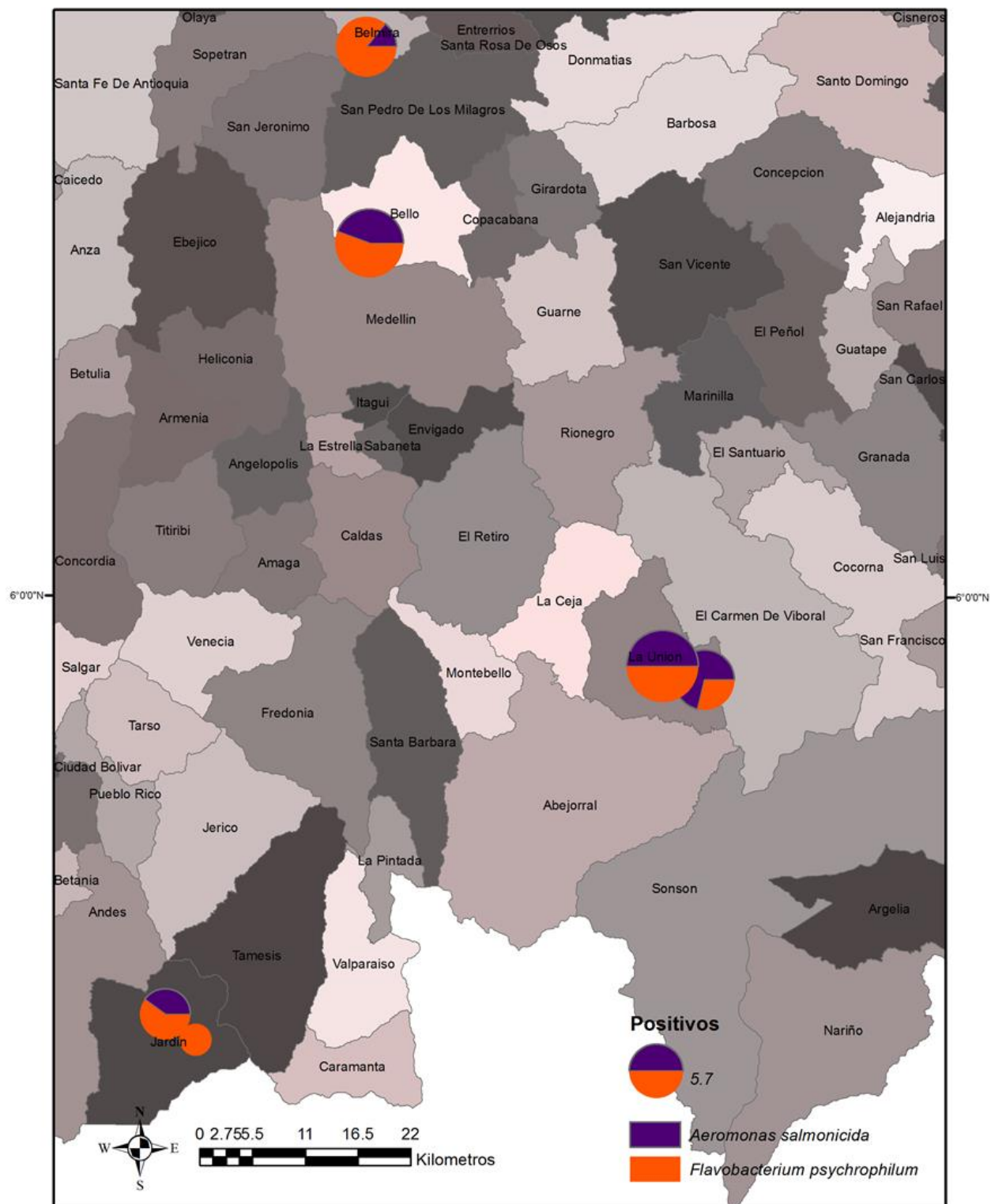


Figura 10. Frecuencia de detección de *Flavobacterium psychrophilum* mediante PCR en Tiempo Real en centros de cultivo de trucha en Antioquia.

Mapa 3. Frecuencia de detección de agentes bacterianos mediante PCR en Tiempo Real en centros de cultivos de trucha arcoíris en diferentes subregiones del Departamento de Antioquia.



4 BIBLIOGRAFÍA

- Padrós, F. y M. D. Furones. 2002. Patología bacteriana en piscicultura. Temas de Actualidad SEM No 34: 13-21.
- Holt, R.A., J.S. Rohovec & J.L. Fryer. 1993. Bacterial cold-water disease. In "bacterial disease of fish" (Inglis, V., Roberts, RJ & Bromage, NR. Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. Pp.3-22.
-
- Borg, AF. 1960. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. American Association for the Advancement of Science, Wildlife Disease 8: 1-85, Washington DC, USA.
-
- Rangdale, R.E., R.H. Richards & D.J. Aldeman. 1996. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surface of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of the European Association Of fish pathologists. 16: 63-67
- Dalsgaard, I. 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. Ann. Rev. Fish Dis. 3: 127-144.
- Austin, B. & D.A. Austin, 1993. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 2a Edit. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK. pp. 228-252.
- Crump, E.M., M.B. Perry, S.C. Clouthier & W.W. Kay. 2001. Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2): 750-759
- Weis, J. 1987. A cold water disease in rainbow trout. Ueber das Vorkommen einer

Kaltwasserkranke bei Regenbogenforellen, *Salmo gairdneri*. Tierärztliche Umschau. 42: 575-577.

- Bernardet, J.F., F. Baudin-Laurencin & G. Tixerant. 1988. First identification of *Cytophaga psychrophila* in France. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 8: 104-105.
- Dalsgaard, I. & V. Horlyck. 1990. *Cytophaga psychrophila* infection in rainbow trout in Denmark (abstract). Proc. Conference on Bacterial Disease on Fish. P.37
- Santos, Y., P.J. Huntly, A. Turnbull, & T.S. Hastings. 1992. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in United Kingdom. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12:209-210.
- Toranzo, A.E. & J.L. Barja. 1993. Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13: 30-32.
- Wiklund, T., K. Kaas, I. Lonnström, & I. Dalsgaard. 1994. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farm rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 14: 44-46.
- Wakabayashi, H., M. Horiuchi, T. Bunya, & T. Hoshiai. 1991. Outbreaks of cold-water disease in coho salmon in Japan. Fish Pathol. 26: 211-212.
- Bustos, P.A., J. Calbuquero, J. Montaña, B. Opazo, P. Entrala & R. Soler. 1995. First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as a causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15: 162-164.
- Ekman, E. 2003. Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Cipriano, R.C. & R.A. Holt. 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-

Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No. 86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV.

- WOLKE R. E. Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish. In RIBELIN W. E., MIGAKI G.: Pathology of Fishes. University of Wisconsin Press, 1975. Pp. 1004.
- Robert M. Durborow, Ronald L. Thune, John P. Hawke and A.C. Camus. Columnaris diseases a bacterial infection caused by *Flavobacterium columnae*. SRAC Publication No. 479, 1998.
- León J, Ávalos R y Ponce M. *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Rev. peru. biol.* 15(2): 117- 124 (Febrero 2009).
- Holt, R.A., J.S. Rohovec & J.L. Fryer. 1993. Bacterial cold-water disease. In “bacterial disease of fish” (Inglis, V., Roberts, RJ & Bromage, NR. Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. Pp.3-22.
- Padrós, F. y M. D. Furones. 2002. Patología bacteriana en piscicultura. Temas de Actualidad SEM No 34: 13-21.
- Holt, R.A. 1994. Cold water Disease. Pp.IV: 1-4, in: Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens, 4a edition, version 1, Thomsen, JC., ed. Fish Health Section. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland.
- Faruk, M.A., R.E. Campbell, K.D. Thompson, R.E. Rangdale & R.H. Richards. 2002. Characterization of *Flavobacterium psychrophilum* the causative agent of rainbow trout fry

syndrome (RTFS) using rabbit antiserum. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 22: 354-365.

- Mata, M., A. Skarmeta & Y. Santos. 2002. A proposed serotyping system for *Flavobacterium psychrophilum*. Lettr. Appl. Microbiol. 35: 166-170.
- Baliarda, D., D. Faure & M.C.Urdaci. 2002. Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Applied Microbiology 92: 510-516.
- İlhan Altınok, Erol Capkin, Sevki Kayis. 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. Veterinary Microbiology 131, 332–338.
- İlhan Altınok, İknur Kurt. 2003. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 3: 131-138.
- Holt, R.A., A. Amadi, J.S.Rohovec, & J.L.Fryer. 1989. Relation of water temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, Chinook salmon and rainbow trout. J. Aquat. Animal Health. 1: 94-101.
- Obach, A., R. Rangdale, & A. Roem. 1995. Rainbow Trout Fry Syndrome. Aetiology, epidemiology, treatment of *Flexibacter psychrophilus* infection. ARC UPDATE. 3.
- Lorenzen, E., I. Dalsgaard, J. From, E.M. Hansen, V. Horlyck, et al. 1991. Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11: 77-79.
- Bustos, P.A., J. Calbuyahue, J. Montaña, B. Opazo, P. Entrala & R. Solervicens. 1995. First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as a causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15: 162-

164.

- Dalsgaard, I. 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3: 127-144.
- Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmans, R. Ducatelle, & F. Haesebrouck. 2003. Adhesion of high and low virulent *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms.* 55: 101-107.
- Obach, A. & F. Baudin-Laurencin, 1991. Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Dis. Aquat. Org.* 12: 13-15.
- Bruun, M.S., I. Madsen & I. Dalsgaard. 2003. Efficacy of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, 215: 11-20.
- Lorenzen, E. 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). Ph. D. Thesis. National Veterinary Laboratory, Arhus and Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Obach, A., R. Rangdale, & A. Roem. 1995. Rainbow Trout Fry Syndrome. Aetiology, epidemiology, treatment of *Flexibacter psychrophilus* infection. *ARC UPDATE.* 3
- Kohler, W., 2007. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International Journal of Medical Microbiology* 297 (2007) 133–150.
- Pier, G.B., Madin, S.H., 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 545–553.
- Facklam, R., Elliott, J., Shewmaker, L., Reingold, A., 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 43, 933–937
- Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Evans, J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in

tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 62, 174–177.

- Iregui C., Hernández E., Jiménez A., Pulido A., Rey A. L. 2004. Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural .38,39 y 70 pág.
- Weinstein, M.R., M. Litt, D.A. Kertesz, P. Wyper, D. Rose, M. Coulter, A. McGeer, R. Facklam, C. Ostach, B.M. Willey, A. Borczyk, D.E. Low (1997) Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *N. Engl. J. Med.* 337:589-594
- Romano. LA., Mejía J. 2003. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. *Revista AquaTIC*, nº 18, pp. 25-32.
- Bromage, E.S., Owens, L., 2002. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Dis. Aquat. Org.* 52, 199–205.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A., Bercovier, H., 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.* 43, 33–40.
- Perera, R., Johnson, S.K., Collins, M.D., Lewis, D.H., 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* × *T. aurea* hybrids. *J. Aquat. Anim. Health* 6, 335–340
- Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A., 1996. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. In: *Second International Symposium on Progress in Fish Vaccinology*, Soria Moria Hotel, Oslo, Norway, June 5–7, pp. 153–160.
- Stoffregen, D., Backman, S., Perham, R., Bowser, P., Babish, J., 1996. Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. *J. World Aquacult. Soc.* 27, 420–434.

- Darwish, A.M., Ismaiel, A.A., 2003. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. J. Aquat. Anim. Health 15, 209–214.
- Fuller J.D., D.J. Bast, V. Nizet, D.E. Low, J.C.S. De Azavedo. 2001. *Streptococcus iniae* Virulence Is Associated with a Distinct Genetic Profile. Infection and Immunity. 69:1994-2000.
- Bachrach, G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D.L. Evans, A. Eldar . 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from Diseased Fish Previously Vaccinated with a *Streptococcus* Vaccine. Applied and Environmental Microbiology. 67:3756- 3758.